

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original article

การตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้าน การอักเสบในการพัฒนาครีมบรรเทาอาการปวดเข่า ด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา

สถาพร สัตย์เชื้อ วท.ม. (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ)*

วิไลลักษณ์ สุกใส วท.ม. (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ)*

สันติ โพธิ์ศรี ปร.ด. (ชีวเคมี)**

นัตรดนัย อุประวรรณ พท.บ. (แพทย์แผนไทย)*

* วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนภิเษก

คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก

** ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ติดต่อผู้เขียน: สถาพร สัตย์เชื้อ Email: Satha.arm@gmail.com

วันรับ:	26 ต.ค. 2567
วันแก้ไข:	18 ก.ค. 2568
วันตอบรับ:	31 ก.ค. 2568

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านการอักเสบและการพัฒนาครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา สายพันธุ์ Charlotte's Angel ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี พบว่า สารสกัดใบกัญชามีสารสำคัญในกลุ่มแอลคาลอยด์ คาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลิก $72.70 \pm 0.03 \mu\text{g GAE/mg extracts}$ และเมื่อวิเคราะห์สาร Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) โดยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) พบสารสำคัญ CBD เท่ากับ $208.2 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$ และ THC เท่ากับ $5.91 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ ในส่วนการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเคราตินไฮโดรตของมนุษย์ (HaCaT) เซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay (MTT assay) พบว่า ความเข้มข้น $1.56-100 \mu\text{g/ml}$ มีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ อยู่ที่ $106.17-13.12$ และ $96.15-10.58$ ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นตั้งแต่ $50 \mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป จะมีความเป็นพิษของสารสกัดใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) พบว่า ความเข้มข้น $1.56-25 \mu\text{g/ml}$ มีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ร้อยละ $84.61-97.85$ และในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา การเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนในสภาวะแรงไม่มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา เมื่อนำไปทดสอบวัดขนาดและการวัดประจุ zeta potential ด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS) พบว่า สูตรที่ดีที่สุด มีค่า hydrodynamic diameters เท่ากับ $234.52 \pm 4.65 \text{ nm}$ ค่า polydispersity index (PDI) เท่ากับ 0.44 ± 0.02 ค่า zeta potential เท่ากับ $-29.60 \pm 0.59 \text{ mV}$ ซึ่งแสดงความเสถียรของสารแขวนลอยที่ดี

คำสำคัญ: สารสกัดใบกัญชา; ครีมบรรเทาอาการปวดเข่า; นวัตกรรมนาโนอิมัลชัน

บทนำ

ปัจจุบันประชากรกำลังมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ “สังคมผู้สูงอายุ” จึงทำให้ประสบกับปัญหาโรคข้อเข่าเสื่อม โรคนี้ในผู้สูงอายุเกิดจากการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนบริเวณผิวข้อ ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามกระบวนการของช่วงวัย อีกทั้งยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องและส่งเสริมให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ อายุ เพศ อาชีพ น้ำหนัก สรีรโมโนความหนาแน่นของเนื้อกระดูก⁽¹⁾ ซึ่งโรคข้อเข่าเสื่อมในผู้สูงอายุนั้น จะเป็นการปวดแบบเรื้อรัง จะปวดมากขึ้นเมื่อเคลื่อนไหว หรือยืนทำกิจกรรมนานๆ หรือขณะวิ่ง และปวดขณะนอนหลับ ลักษณะการปวดแบบตื้อๆ ปวดในข้อเข่าทั่วไป อาการปวดจะค่อยเป็นค่อยไป รวมทั้งมีอาการข้อฝืด มีเสียงดังในข้อเมื่อเคลื่อนไหว⁽²⁾ ซึ่งการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเป็นการรักษาแบบประคับประคอง เนื่องจากยังไม่พบวิธีการรักษาใดที่สามารถยับยั้งกระบวนการเสื่อมของข้อเข่าที่เกิดขึ้นได้ และจุดมุ่งหมายในการรักษา คือ การลดอาการปวด จึงทำให้การเคลื่อนไหวของข้อนั้นเป็นไปได้ตามปกติ ป้องกันหรือการแก้ไขการผิดรูปของข้อ และทำให้ผู้ป่วยปฏิบัติกิจวัตรประจำวันได้ตามปกติ วิธีการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมที่นิยมในปัจจุบันมี ได้แก่ การรักษาที่ไม่ใช้ยา การรักษาโดยการฉายแสง นวัตกรรมของการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม และการรักษาโดยการผ่าตัด⁽²⁾ จากข้อจำกัดในการผ่าตัด หรือการใส่ยาสเตียรอยด์ ผู้ป่วยหันมาพึ่งพาและบรรเทาอาการปวดด้วยยาสมุนไพรมากขึ้น ซึ่งกัญชา (*Cannabis sativa* L.) เป็นที่นิยมในการใช้บรรเทาอาการต่างๆ เนื่องจากมีสารแคนนาบินอยด์ เตลต้า-ไนน์-เตตราไฮโดรแคนนาบินอล และแคนนาบิไดโอด ช่วยลดอาการปวดเรื้อรัง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ⁽³⁾ จากความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าปัจจุบันยังมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าจากสารสกัดกัญชาด้วยเทคนิคขั้นสูงในประเทศไทยยังมีน้อย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำสารสกัดกัญชาจากส่วนของใบ ที่มีประโยชน์ในการบรรเทาปวดและมีสรรพคุณด้านการรักษาด้วยศาสตร์การแพทย์-

แผนไทย ซึ่งจากรายงานพบว่าสารสกัดกัญชาประกอบไปด้วยส่วนผสมของ Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) สามารถช่วยลดอาการปวดข้อได้ จึงได้ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ปริมาณพอลิฟีนอลิก ฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และการวิเคราะห์สาร THC และ CBD โดยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) ในสารสกัดใบกัญชา เพื่อนำผลการศึกษามาพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชัน สำหรับกลุ่มผู้สูงอายุ อีกทั้งเป็นการส่งเสริมคุณภาพชีวิตของประชากรที่กำลังมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุในอนาคต

วิธีการศึกษา

การวิจัยและพัฒนา (The Research and Development: R&D) ใบกัญชาได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท เพลาเพลิน จำกัด โดยวิธีการดำเนินงานวิจัย มีลำดับขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดใบกัญชา

นำใบกัญชาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (°C) นำไปบดหยาบ 500 g มาแช่ด้วยเอทานอล 500 ml โดยแช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใส (ทำ 3 ครั้ง) ที่ได้รวมกัน นำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง นำไประเหยตัว-ทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40°C นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dryer) จากนั้นชั่งน้ำหนักสารที่สกัดได้และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2. การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี (phytochemicals)

2.1 วิธีตรวจสอบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids)⁽⁴⁾
โดยเตรียมสารสกัดใบกัญชา ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ปริมาตร 1 ml ระเหยให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วย 5% กรดซัลฟิวริก 5 ml กรองเอาสารละลายมาแบ่งเป็น

3 ส่วนใส่ในหลอดทดลอง หลอดทดลองที่ 1 เติม Wagner's reagent หลอดทดลองที่ 2 เติม Mayer's reagent หลอดทดลองที่ 3 เติม Dragendroff's reagent การแปลผล ผลบวก Wagner's reagent คือ เกิดตะกอนสีน้ำตาลของสารประกอบแฮโลเจน Mayer's reagent คือ เกิดตะกอนสีขาวหรือสีครีม และ Dragendroff's reagent คือ เกิดตะกอนสีส้มหรือ สีแดงหรือน้ำตาล ถ้าให้ผลบวก แสดงว่าสารสกัดมีสารกลุ่มแอลคาลอยด์

2.2 วิธีตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponins)⁽⁴⁾ ด้วยวิธี Liebermann-Burchard's method: เตรียมสารสกัดใบกัญชา ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ปริมาตร 5 ml ระเหยให้แห้ง แล้วหยดด้วยน้ำยา acetic anhydride 3 หยด และหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 หยด ผลบวกจะให้สีน้ำเงิน-เขียว

การตรวจสอบการเกิดฟอง: เติมน้ำร้อน ปริมาตร 5 ml ลงในสารสกัด หลังจากนั้นเขย่าหลอดทดลองขึ้นลง ประมาณ 10 วินาที สังเกตลักษณะของฟองที่เกิดขึ้น วัดความสูงของฟอง หลังจากนั้นหยด ร้อยละ 5 ของกรดไฮโดรคลอริก 1 หยด สังเกตฟอง ถ้าฟองยังอยู่แสดงว่ามีสารกลุ่มซาโปนิน ฟองจะมีลักษณะคล้ายรังผึ้ง

การแปลผล ผลบวกกับการตรวจสอบการเกิดฟอง และให้สีน้ำเงิน-เขียว ด้วยวิธี Liebermann-Burchard's แสดงสารสกัดมีสาร steroidal saponins และถ้าให้ผลบวกกับการตรวจสอบการเกิดฟอง และให้สีแดง สีมชมพู หรือ มีม่วงแดง ด้วยวิธี Liebermann-Burchard's method แสดงสารสกัดมีสาร triterpenoidal saponins

2.3 วิธีตรวจสอบสารกลุ่มแทนนิน (tannins)⁽⁴⁾ โดยเตรียมสารสกัดใบกัญชา ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ปริมาตร 5 ml

ส่วนที่ 1 นำสารสกัดใบกัญชา ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ปริมาตร 1 ml ระเหยให้แห้งเติมน้ำละลาย 10% โซเดียมคลอไรด์ 2-3 หยด กรองสารละลายเอาส่วนตะกอนทิ้ง สารละลายที่ได้แบ่งเป็น 3 หลอด ประกอบด้วย

หลอดที่ 1 เติมน้ำยา gelatin 1% 5 หยด

หลอดที่ 2 เติมน้ำยา gelatin salt 5 หยด

หลอดที่ 3 หลอดควบคุม

ผลบวกจะได้ตะกอนในหลอดที่ 1 และ 2

ส่วนที่ 2 นำสารสกัด ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ปริมาตร 4 ml แบ่งเป็น

หลอดที่ 1 หลอดควบคุม

หลอดที่ 2 เติมน้ำยา ferric chloride 1% 5 หยด ผลบวก จะได้สีน้ำเงิน หรือ สีเขียว

หลอดที่ 3 เติมน้ำยา bromine water 5 หยด ผลบวก จะได้ตะกอนสีเบาส้ม

หลอดที่ 4 เติมน้ำยา lime water 5 หยด ผลบวก จะได้ตะกอนสีเทาเหลืองๆ

การแปลผล

1) ให้ผลลบกับน้ำยา gelatin และ gelatin salt ไม่ให้สีกับ 1% ferric chloride แสดงว่าสารสกัดไม่มีสารกลุ่มแทนนิน

2) ให้ผลบวกกับน้ำยา gelatin และ gelatin salt ให้สีเขียวกับน้ำยา ferric chloride ให้ผลบวกกับน้ำยา bromine water และให้ผลลบกับน้ำยา lime water แสดงว่าสารสกัดมีสารกลุ่มแทนนินชนิด condensed tannins

3) ให้ผลบวกกับน้ำยา gelatin และ gelatin salt ให้สีน้ำเงินเขียวหรือน้ำเงินดำกับน้ำยา ferric chloride ให้ผลบวกกับน้ำยา lime water และให้ผลลบกับน้ำยา bromine water แสดงว่าสารสกัดมีสารกลุ่มแทนนินชนิด hydrolysable tannins

2.4 วิธีตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids)⁽⁴⁾ ด้วยวิธี Shinoda's method โดยเตรียมสารสกัดใบกัญชา ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ปริมาตร 3 ml หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 ml แล้วเติม magnesium ribbon แผ่นเล็กๆ ประมาณ 5-8 แผ่น เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จะให้ผลบวกสีส้ม-แดง

2.5 วิธีการตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)⁽⁴⁾ ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) เตรียมสารสกัดใบกัญชา ความเข้มข้น 1,000 µg/ml สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ครั้งละ 3-5 ml จำนวน 2-3 ครั้ง แล้ว

เติมคลอโรฟอร์ม 2 ml เขย่าค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริก-เข้มข้น ($\text{conc. H}_2\text{SO}_4$) หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

2.6 วิธีตรวจสอบสารกลุ่มคาร์ดิแอกกลัยโคไซด์ (Cardiac Glucosides) ⁽⁴⁾ โดยเตรียมสารสกัดใบกัญชา ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 5 ml เติมสารละลาย 10% lead acetate ปริมาตร 10 ml ระเหยด้วยความร้อน ประมาณ 15 นาที กรองเอาสารละลาย สกัดต่อด้วย ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 10 ml หลังจากนั้นเติมสารดูดความชื้นโซเดียมซัลเฟต ชนิดแห้ง นำสารสกัดไดคลอโรมีเทนไปตรวจสอบ

ทดสอบส่วนสเตรอยด์ด้วยการทดสอบ Liebermann โดยนำสารสกัดไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 5 ml ระเหยให้แห้ง แล้วหยดด้วยน้ำยา acetic anhydride 3 หยด และหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 หยด ผลบวกจะให้สีน้ำเงิน-เขียว

ทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว ด้วย Kedde reagent สารสกัดมา 5 ml ใส่ในถ้วยกระเบื้อง แล้วนำไประเหยจนแห้งบน water bath เติม Kedde's reagent (3,5 dinitrobenzoic acid 2 g ละลายในเอทานอล) 2-3 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น ผลบวกจะให้วงแหวนสีม่วง

ทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซีด้วยการทดสอบ Keller-Kiliani นำสารสกัดมา 1 ml เติม glacial acetic acid 1 ml ค่อยๆ หยด $\text{conc. H}_2\text{SO}_4$ (กรดซัลฟิวริก) ให้ไหลลงข้างหลอด เติม FeCl_3 2-3 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงจะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก

3. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลิก⁽⁵⁾

3.1 ผสมสารละลายสารสกัดใบกัญชา ที่ละลายด้วยน้ำ (ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$) ปริมาตร 20 μl กับ 1 M Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 μl และ 710 mM โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 80 μl ลงใน 96-well plate

3.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที

และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

3.3 คำนวณหาปริมาณพอลิฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ($\mu\text{gGAE/mg Extracts}$)

4. การศึกษาผลของสารสกัดใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเคราติโนไซต์ของมนุษย์ (HaCaT) เซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay: MTT assay) และการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7

4.1 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT ด้วยวิธี MTT assay⁽⁶⁾

1) เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C และทำการ sub-cultured ทุกๆ 3-4 วัน

2) นำเซลล์มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อ 1 well จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C

3) หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สารสกัดละลายอยู่ในความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO_2 incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์

96 หลุม (96 well plates) เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

5) เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) จากนั้นเติม 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาณ 150 µl/well เพื่อละลายผลึก formazan salt ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท คำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) จากสูตร

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (\%Cell viability)} = \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง

4.2 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT assay⁽⁷⁾

1) เพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 จำนวน 1×10^5 cells/well ใน 96-well plate โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 90% ร่วมกับ FBS 10% Antibiotic 1% (streptomycin, penicillin, amphotericin B) บ่มในตู้ CO₂ incubator ที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติมสาร lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ng/ml 50 µl ใน 96-well plate

3) เติมสารสกัดใบกัญชาที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 µg/ml 100 µl ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะสาร DMSO (0.5% v/v) (penicillin เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก) ใน 96-well plate บ่มในตู้ CO₂ incubator ที่มี CO₂ 5%

อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เก็บ supernatant เพื่อวิเคราะห์การยับยั้งการสร้าง nitric oxide)*

4) หลังจากนั้นเติม MTT 0.5 mg/ml 10 µl ใน 96-well plate เคา plate เบาๆ แล้วนำไปบ่มในตู้ CO₂ incubator ที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นดูด supernatant ออกทุกหลุม ทำให้เซลล์แตกและละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO ปริมาตร 100 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้ penicillin เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก และคำนวณหาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%Cell viability) จากสูตร

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (\%Cell viability)} = \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง

*โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่จะนำไปพัฒนาครีมต้องมีค่า %Cell viability มากกว่า 70%

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7⁽⁷⁾

นำ supernatant ที่ถูกเก็บไว้ในข้อ 3) จากเซลล์เพาะเลี้ยงคงเดิม RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 µg/ml มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide โดยวัดปริมาณของไนตริกออกไซด์ ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ นำ supernatant ดังกล่าว ปริมาตร 100 µl ลง 96-well plate เติม Griess reagent 100 µl ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณร้อยละการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว จากสูตร

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการสร้าง nitric oxide} = \left[\frac{(\text{NO}_{\text{control}} - \text{NO}_{\text{sample}})}{\text{NO}_{\text{LPS}}} \right] \times 100$$

เมื่อ NO_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด)

NO_{LPS} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว)

NO_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง
* โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่จะนำไปพัฒนาครีม ต้องมีค่าการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ดีที่สุด

5. การวิเคราะห์สาร THC และ CBD โดยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)⁽⁸⁾
การวิเคราะห์สาร THC และ CBD โดยเทคนิค HPLC สภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ประกอบด้วย column: Kinetex[®] 2.6 μm C18 100 Å, column 30 x 4.6 mm; column oven = 40°C ตัวอย่างละลายในตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/ml mobile phase: acetonitrile: 20 mM ammonium formate (25:75) flow rate เท่ากับ 0.8 ml/min injection volume เท่ากับ 5 μl Wavelength เท่ากับ 220 nm

6. การพัฒนาครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชาในรูปแบบผลิตภัณฑ์ครีม ที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว ประกอบด้วยสารแขวนตะกอนที่เป็นอนุภาคเล็ก ปริมาตรรวม 100 ml ประกอบด้วย (1) *Cannabis sativa* L. extract, (2) Oleic acid, (3) Tween 80, (4) vitamin E, (5) mild preservative EcoTM (Ethylhexylglycerin) และ (6) purified water

โดยการเตรียมผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชัน โดยใช้วิธี spontaneous emulsification ดังนี้

สูตรที่ 1

1. ชั่งองค์ประกอบหมายเลข 1, 2, 3 และ 5 ลงใน บีกเกอร์ ขนาด 200 ml ผสมโดยใช้ magnetic stirrer ที่ความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 30 นาที (จัดเป็น oil phase)

2. ชั่งองค์ประกอบหมายเลข 6 ใน บีกเกอร์ ขนาด 200 ml (จัดเป็น aqueous phase)

3. เท oil phase ลงใน burette

4. หมุน burette ไปที่ขีดที่ทำเครื่องหมายไว้ เพื่อผสม oil phase ลงใน aqueous phase อย่างช้า ๆ (อัตราเร็ว 0.5 g/min) บน magnetic stirrer ด้วยอัตราเร็ว 750 rpm เป็นเวลา 20 นาที

5. ปั่นผสมต่ออีก 5 นาที จากนั้นนำครีมนาโนอิมัลชัน ที่ได้ใส่ในบรรจุภัณฑ์

สูตรที่ 2

1. ชั่งองค์ประกอบหมายเลข 1, 2, 3, 4 และ 5 ลงใน บีกเกอร์ ขนาด 200 ml ผสมโดยใช้ magnetic stirrer ที่ความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 30 นาที (จัดเป็น oil phase)

2. ชั่งองค์ประกอบหมายเลข 6 ใน บีกเกอร์ ขนาด 200 ml (จัดเป็น aqueous phase)

3. เท oil phase ลงใน aqueous phase บน magnetic stirrer ด้วยอัตราเร็ว 750 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. นำครีมนาโนอิมัลชัน ที่ได้ใส่ในบรรจุภัณฑ์

7. การทดสอบคุณภาพด้านการใช้ของผลิตภัณฑ์ (performance test) การทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา โดยการทดสอบในห้องปฏิบัติการ (laboratory test) ดังนี้

7.1 การทดสอบด้านประสาทสัมผัส ซึ่งประเมินความรู้สึกในการใช้ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา พิจารณาโดยรวมของการซึมซาบเข้าผิวหนัง ความเหนอะหนะ ลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัวของครีม แล้วบันทึกผล

7.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ โดยดูจากลักษณะภายนอกของครีม เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับที่ทดสอบความคงตัวไว้ 6 cycle โดยพิจารณาจากลักษณะเนื้อครีม สี กลิ่น การไหลของครีม การเกิด creaming และการเกิด cracking⁽⁹⁾ แล้วบันทึกผล

7.3 ประเมินคุณสมบัติทางเคมี โดยทดสอบความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ โดยใช้เครื่อง pH meter แล้วบันทึกผล ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับใช้กับผิวหนังซึ่งมีค่า

ความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงของผิวหนังบริเวณผิวหนัง และผิวกายจะมีค่า pH อยู่ระหว่าง 5.4–5.9⁽¹⁰⁾

7.4 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา สังเกตได้จาก ครีมีมีจุดดำหรือเส้นใย ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นหรือไม่

7.5 การทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน⁽¹¹⁾ ดังนี้

1) การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยวิธี centrifugal test โดยการทดสอบความคงตัวด้วยการปั่นเหวี่ยง ที่ 3500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง centrifugation จากนั้นสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้น ด้วยสายตา ถ้าไม่เกิดการแยกชั้น แสดงว่าอิมัลชันมีความคงตัว

2) การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยวิธี Cooling-Heating cycle นำอิมัลชันที่ไม่เกิดการแยกชั้น มาเพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน โดยเก็บตัวอย่างของอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C ในเวลาที่เท่ากัน ทำการทดลองซ้ำจนครบ 6 รอบ สังเกตลักษณะที่เกิดขึ้นด้วยสายตา ถ้าไม่เกิดการแยกชั้น แสดงว่าอิมัลชันมีความคงตัว

3) การทดสอบความคงตัวด้วยวิธี freezing-thawing cycle นำอิมัลชันที่ไม่เกิดการแยกชั้น มาทดสอบ ความคงตัวต่อเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในสภาวะเร่งที่มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน โดยทำการแช่แข็งตัวอย่างของอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ -21°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ในเวลาที่เท่ากัน ทำการทดลองซ้ำจนครบ 3 รอบ แล้วทำการสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้นด้วยสายตา ถ้าไม่เกิดการแยกชั้นแสดงว่า อิมัลชันมีความคงตัว⁽¹²⁾

7.6 การหาขนาดและการวัดประจุ Zeta Potential ของนาโนอิมัลชัน⁽¹¹⁾ นำอิมัลชันที่ผ่านการทดสอบความคงตัวขั้นสุดท้ายโดยวิธี Freezing-Thawing cycle ส่งตรวจที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering (DLS) โดย Zeta Potential เป็นค่าที่บอกถึงความคงตัวของตำรับได้ เช่นเดียวกัน ประจุที่ล้อมรอบแต่ละอนุภาคในนาโนอิมัลชันควรมีประจุลบเพื่อให้เกิดแรงผลักรันอย่างอ่อนๆ ระหว่างอนุภาค เพื่อหลีกเลี่ยง

การเกิดปรากฏการณ์ coalescence กล่าวคือ ตำรับที่มีความคงตัวดีจะมีค่า zeta potential น้อยกว่า -20 mV ถ้าค่า มากกว่านี้เพิ่มโอกาสเกิด coalescence

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลิก จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ และการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์ จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA)

3. การวิเคราะห์สาร THC และ CBD จะแสดงผลเป็นเชิงปริมาณ

ผลการศึกษา

1. การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบกัญชา โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

การศึกษาค่าองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% พบสารพฤกษเคมีในกลุ่มแอลคาลอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่ไม่พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังตารางที่ 1

2. การทดสอบหาปริมาณพอลิฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ในสารสกัดใบกัญชา ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลิกเท่ากับ 72.70±0.03 µg GAE/mg extracts

3. การศึกษาผลของสารสกัดใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT และ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT assay และการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7

ตารางที่ 1 การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบกัญชาโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

กลุ่มสาร	การทดสอบ/น้ำยา	ผลการทดสอบ	หมายเหตุ
แอลคาลอยด์	น้ำยา Wagner's reagent	+++	
	น้ำยา Mayer's reagent	+++	
	น้ำยา Dragendorff's reagent	+++	
ซาโปนิน	Liebermann-Burchard's method	++	steroidal saponins
	การเกิดฟอง	++	
แทนนิน	1% gelatin	++	condensed tannins
	gelatin salt	++	
	1% ferric chloride	++	
	bromine water	++	
	lime water	-	
เทอร์ปีนอยด์	Salkowski test	+++	
ฟลาโวนอยด์	Shinoda's method	-	
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	Liebermann test	+++	
	Kedde reagent	+++	
	Keller-Kiliani test	+++	

หมายเหตุ: Positive (+++) คือ สีเข้มมากหรือมีตะกอน แสดงว่าเกิดปฏิกิริยามาก

Positive (++) คือ สีเข้มนปานกลางหรือมีตะกอน แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาปานกลาง

Positive (+) คือ สีเข้มน้อยหรือมีตะกอน แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาน้อย

Negative (-) คือ ไม่เกิดปฏิกิริยาหรือไม่เกิดตะกอนกับน้ำยาทดสอบ

3.1 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.56–100 $\mu\text{g/ml}$ มีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) อยู่ที่ 106.17–13.12 ซึ่งพบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป จะมีความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชา ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชา ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 2 แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 70–80%

3.2 ผลศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT assay

พบว่า ความเข้มข้น 1.56–100 $\mu\text{g/ml}$ มีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) อยู่ที่ 96.15 – 10.58 ซึ่งพบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป จะมีความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชา ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3 แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ 70–80%

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ RAW 264.7 ในรูปของ

ตารางที่ 2 การรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (% cell viability) HaCaT ที่ทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95%

ความเข้มข้นของสารสกัด	ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)				mean±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	
Untreated	96.50	109.78	99.95	93.78	100.00±6.99
1.56 µg/ml	120.03	106.04	88.60	110.00	106.17±13.10
3.13 µg/ml	124.04	89.72	99.44	102.53	103.93±14.47
6.25 µg/ml	124.30	107.92	107.82	113.27	113.33±7.74
12.50 µg/ml	117.38	92.48	90.76	101.96	100.65±12.20
25.00 µg/ml	110.09	90.60	99.81	98.61	99.78±8.00
50.00 µg/ml	44.76	30.76	29.91	32.83	34.57±6.91*
100.00 µg/ml	12.26	14.07	11.95	14.18	13.12±1.17*

*p<0.05

ตารางที่ 3 การรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (% cell viability) RAW 264.7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95%

ความเข้มข้นของสารสกัด	ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)				mean±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	
Untreated	88.99	96.95	106.52	107.54	100.00±8.76
1.56 µg/ml	82.81	90.21	105.22	106.35	96.15±11.54
3.13 µg/ml	82.07	88.68	100.53	107.87	94.79±11.59
6.25 µg/ml	81.12	82.07	93.58	105.66	90.61±11.52
12.50 µg/ml	74.50	79.80	82.23	103.21	84.93±12.60
25.00 µg/ml	72.60	79.41	84.11	89.19	81.33±7.06
50.00 µg/ml	12.81	10.52	10.90	23.56	14.45±6.15*
100.00 µg/ml	10.45	10.33	10.45	11.07	10.58±0.34*

*p<0.05

ไนโตรที่ พบว่า สารสกัดจากใบกัญชา ความเข้มข้น 1.56–25 µg/ml มีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ อยู่ที่ร้อยละ 84.61–97.85 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) อยู่ที่ 93.62–97.22 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่

ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% แสดงดังตารางที่ 4

4. การวิเคราะห์สาร THC และ CBD โดยเทคนิค HPLC ของสารสกัดจากใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% พบสารสำคัญ CBD เท่ากับ 208.23 ± 0.47 µg/ml และ THC เท่ากับ 5.91 ± 0.05 µg/ml แสดงดังภาพที่ 1

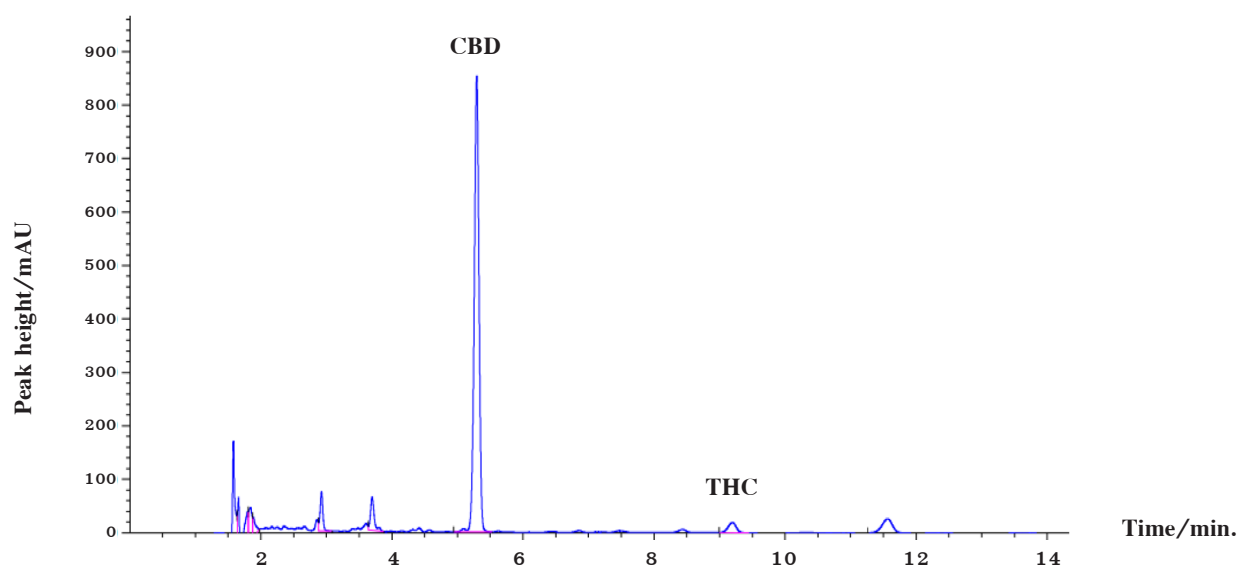
การตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ด้านการอักเสบในการพัฒนาครีมบรรเทาอาการปวดเข่า

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95%

ความเข้มข้นของสารสกัด	ฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง nitric oxide (µg/ml)				mean±SD	% cell viability (mean±SD)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4		
Untreated	17.64	19.08	22.41	–	19.71±2.45	
Lipopolysaccharide	91.95	100.34	104.64	103.07	100.00±5.65	100.00±10.34
1.56 µg/ml	87.18	95.32	98.33	110.56	97.85±9.70*	93.62±10.10
3.13 µg/ml	96.54	95.46	98.44	103.68	98.53±3.64*	93.60±7.40
6.25 µg/ml	91.88	95.46	98.48	100.95	96.69±3.92*	95.23±6.56
12.50 µg/ml	93.67	93.35	95.71	97.83	95.14±2.08*	98.28±6.77
25.00 µg/ml	85.71	82.70	82.09	87.93	84.61±2.72*	97.22±6.46

*p<0.05

ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสาร THC และ CBD ของสารสกัดจากใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล



5. ผลพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา

5.1 การสกัดใบกัญชา สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% จะมีลักษณะเป็นของเหลว มีสีเขียวเข้ม เหนียว มีความหนืด มีกลิ่นเฉพาะของใบกัญชา และพบว่าร้อยละของผลผลิต (% yield) เท่ากับ 9.30

5.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี

ของผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา จากการทดสอบด้านประสาทสัมผัส การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี จำนวน 2 สูตร พบว่า สูตรที่ 2 ผ่านเกณฑ์การทดสอบดีที่สุด ในการทดสอบด้านประสาทสัมผัส มีเนื้อครีมที่ทาทั้งไว้บริเวณเข่าให้ความรู้สึกแห้งเหมือนไม่ได้ทาครีม เนื้อครีมไม่มีความเหนอะหนะ สีของเนื้อครีมสีเขียวอ่อนๆ ให้ความน่าใช้ การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทาง

เคมี มีลักษณะเนื้อครีมเนียนละเอียดดีมาก สีของเนื้อครีม สีเขียวอ่อน ๆ มีความน่าใช้ มีกลิ่นเฉพาะของใบกัญชา การไหลของครีมไหลได้ดี ไม่มีการเกิด Creaming ไม่มีการเกิด Cracking ทดสอบความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ เครื่อง pH meter พบว่า ผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่า ด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชามีค่า pH เท่ากับ 5.6 เป็นค่าที่เหมาะสม การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา เมื่อทดสอบความคงตัวไว้ 6 cycle พบว่า ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยวิธี Centrifugal test พบว่า ไม่เกิดการแยกชั้นน้ำและน้ำมันอย่างชัดเจน แสดงว่า อิมัลชันมีความคงตัว การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยวิธี Cooling-Heating cycle พบว่า การไหลของครีมไหลได้ดี ไม่มีการเกิด Creaming และ Cracking การทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Freezing-Thawing cycle พบว่า การไหลของครีมไหลได้ดี ไม่มีการเกิด Creaming และ Cracking ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในสภาวะเร่งจึงไม่มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน และการหาขนาดและการวัดประจุ Zeta Potential ของนาโนอิมัลชัน ผลการทดสอบวัดขนาดและการวัดประจุ Zeta Potential พบว่า มีค่าเท่ากับ 234.52 ± 4.65 nm ค่า polydispersity index (PDI) คือ ค่าการกระจายตัวของพอลิเมอร์ มีค่าเท่ากับ 0.44 ± 0.02 และค่า zeta potential มีค่าเท่ากับ -29.60 ± 0.59 mV ดังนั้นสูตรที่ 2 มีความเสถียรของสารแขวนลอยที่ดี จึงเป็นตำรับที่มีความคงตัวดี

วิจารณ์

การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% จะประเมินจากการเปลี่ยนสี การเกิดฟอง รวมทั้งการเกิดตะกอนของสารสกัดเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบกัญชาแสดงผลบวกขององค์ประกอบทางพฤกษเคมี พบสารสำคัญในกลุ่มแอลคาลอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่ไม่พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ใน

การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของสมิตา และ มูอำหมัด⁽¹³⁾ ที่รายงานไว้ในสารสกัดหยาบกัญชาพบสารพฤกษเคมี เทอร์ปีนอยด์ แทนนิน และ แอลคาลอยด์ ซึ่งสารกลุ่มแอลคาลอยด์ พบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาการปวดได้ และสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ ช่วยในเรื่องการผ่อนคลายและบรรเทาความเครียด กลุ่มสารซาโปนิน เป็นสารต้านจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบหาปริมาณพอลิฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นอยู่ในช่วง $1000 \mu\text{g/ml}$ มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลิก ในการทดสอบปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลิกครั้งนี้ พบว่าสอดคล้องกับผลการศึกษา ที่รายงานไว้ว่าสารสกัดใบกัญชา มีสารสำคัญในกลุ่มพอลิฟีนอลิก⁽¹⁴⁾ และการที่สารสกัดมีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลิก จะแสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือการต้านออกซิเดชัน⁽¹⁵⁾ เมื่อร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไปจนเกินความสามารถของกลไกการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ โมเลกุลอนุมูลอิสระอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอ เปลี่ยนสภาพของโปรตีนและไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดโรคที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ โรคชรา โรคเบาหวาน เป็นต้น⁽¹⁶⁾ ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไปได้ว่าสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% อาจมีศักยภาพช่วยในการบรรเทาอาการปวดเข่า

การศึกษาผลของสารสกัดใบกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT ด้วยวิธี MTT assay ที่ช่วงความเข้มข้น $1.56-100 \mu\text{g/ml}$ เซลล์มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแสดงเป็นค่าร้อยละของการมีชีวิตรอด และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอลจากการศึกษาพบว่า การรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดการ

รอดชีวิตมากที่สุดอยู่ในเกณฑ์ ร้อยละ 70-80 ตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 1.56-25 µg/ml ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้กล่าวว่า เกณฑ์มาตรฐานการรอดชีวิตเซลล์ เท่ากับร้อยละ 70-80⁽¹⁷⁾ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์-เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT assay ที่ช่วงความเข้มข้น 1.56-100 µg/ml เซลล์มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแสดงเป็นค่าร้อยละของการมีชีวิตรอด และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% จากการศึกษา พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดการรอดชีวิตมากที่สุดอยู่ในเกณฑ์ ร้อยละ 70-80 ตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 1.56-25 µg/ml ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้กล่าวว่า เกณฑ์มาตรฐานการรอดชีวิตเซลล์เท่ากับร้อยละ 70-80⁽¹⁷⁾ การตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ RAW 264.7 ในรูปของไนโตรท์ พบว่า สารสกัดจากใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ความเข้มข้น 1.56-25 µg/ml มีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ อยู่ที่ร้อยละ 84.61- 97.85 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% เมื่อพิจารณาทางด้านการใช้สารสกัดในปริมาณน้อย (ความเข้มข้นต่ำๆ) จะพบในสารสกัดที่ความเข้มข้น 1.56 µg/ml และมีฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ดี ร้อยละ 97.85±9.70 และมี การรอดชีวิตของเซลล์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน⁽¹⁷⁾ เท่ากับร้อยละ 93.62 ซึ่งสามารถนำสารสกัดความเข้มข้นดังกล่าวเป็นส่วนผสมในการพัฒนาครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชาได้ โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเป็นไปได้ว่าสารสกัด-หยาบประกอบด้วยสารสำคัญหลายตัวที่ช่วยเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่ออยู่รวมตัวกันในการยับยั้งการสร้างไนตริก-ออกไซด์⁽¹⁸⁾

การวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% โดยเทคนิค HPLC พบ

สารสำคัญ CBD และ THC ในสารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของศิริวัชรโรชชัย และคณะ⁽¹⁹⁾ ที่รายงานว่า การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ cannabidiol และ tetrahydro cannabinoid โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า สารสกัดกัญชาส่วนใบมีปริมาณ cannabidiol และ tetrahydro cannabinoid เท่ากับ 2.45 µg และ 9.83 mg ต่อสาร-สกัดหยาบ 100 g และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ ผกาทิพย์ รื่นระเรงศักดิ์⁽²⁰⁾ ที่รายงานว่าต้นกัญชามีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิดเป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ THC และสารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น Cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), cannabichtomme (CBC), cannabigerol (CBG) ซึ่งสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ส่วนใหญ่โดยเฉพาะ THC สามารถใช้ลดอาการปวดแบบฉับพลัน แบบเรื้อรัง (acute และ chronic pain) CBD สามารถช่วยลดอาการปวดข้อ (rheumatoid arthritis) และยังพบว่า THC และ CBD สามารถช่วยลดอาการหดเกร็งของกล้ามเนื้อและช่วยบรรเทาอาการปวดดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไปได้ว่า สารสกัดใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% อาจมีศักยภาพช่วยในการบรรเทาอาการปวดเข่า

5. การพัฒนาและทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีของครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา โดยคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี ของผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข่าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา สูตรที่ 2 มีลักษณะของเนื้อครีมเนียนละเอียดดีมาก เมื่อทาทั้งไว้บริเวณเข่าให้ความรู้สึกแห้งเหมือนไม่ได้ทาครีม เนื้อครีมไม่มีความเหนอะหนะ สีของเนื้อครีมสีเขียวน้ำตาลอ่อนๆ มีความน่าใช้ การไหลของครีมไหลได้ดี ไม่มีการเกิด Creaming และ Cracking มีค่า pH เท่ากับ 5.6 เป็นค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับใช้กับผิวหนัง เพราะมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงของผิวหนังบริเวณผิวหนังและผิวกายจะมีค่า pH

อยู่ระหว่าง 5.4–5.9⁽¹⁰⁾ ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา และผลการทดสอบการคงตัวด้วยวิธี centrifugal test วิธี cooling–heating cycle และวิธี freezing–thawing cycle พบว่า มีความคงสภาพที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในสภาวะเร่งจึงไม่มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน⁽¹¹⁾ ซึ่งสอดคล้องกับค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า⁽²¹⁾ การวัดขนาดอนุภาคภายในวัฏภาคของสูตรที่ 2 ใช้เทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต และมีการเคลื่อนที่แบบบราวน์ (Brownian movement) มุมของการกระเจิงแสงที่เลือกใช้ในการวัดเป็น 173 องศา และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เคลื่อนที่ จากนั้นนำไปคำนวณเป็นค่าขนาดของอนุภาคซึ่งได้ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคเป็นค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคในเชิงปริมาตร มีค่าเท่ากับ 234.52 ± 4.65 nm สำหรับขนาดอนุภาคที่สามารถซึมผ่านสู่ชั้นผิวหนังได้ควรมีค่าน้อยกว่า 600 nm⁽²²⁾ อย่างไรก็ตามขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ครีมบรรเทาอาการปวดเข้าด้วยนวัตกรรมนาโนอิมัลชันจากสารสกัดใบกัญชา สูตรที่ 2 มีค่าน้อยกว่า 600 nm ดังนั้นจึงสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ ส่วนค่าการกระจายขนาดอนุภาคที่น้อยกว่า 0.5 สะท้อนถึงความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคในสูตรที่ 2⁽²³⁾ และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า มีค่าเท่ากับ -29.60 ± 0.59 mV ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่ดีจะต้องสูงกว่า ± 20 mV⁽²¹⁾ โดยความคงสภาพของสูตรที่ 2 เกิดขึ้นจาก แรงผลักระหว่างอนุภาคภายใน แสดงให้เห็นถึงความคงสภาพของสูตรได้ดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณงบประมาณด้านวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) เพื่อสนับสนุนงานมูลฐาน (fundamental fund) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก และมหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ รวมทั้ง ดร. ภญ. วรัญญา อรุโณทยานันท์ ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ และบริษัทเพลาเพลินจำกัด จังหวัด

บุรีรัมย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใบกัญชาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Ilieva EM, Oral A, Kucukdeveci A, Varela E, Valero R, Berteau M, et al. Osteoarthritis, the role of physical and rehabilitation medicine physicians, the European perspective based on the best evidence. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine* 2013;49:579–92.
2. สุวรรณิ สร้อยสงค์, อังคณา เรือนก้อน, ภณทิรา เพื่องทอง, ผุสดี สระทอง. การพยาบาลผู้สูงอายุโรคข้อเข่าเสื่อม. *วารสารวิชาการแพทย์ เขต 11* 2562;33(2):197–209.
3. โขมพักตร์ มณีวัต, ศศิกันต์ นิยมานรงค์, พุฒิสักดิ์ พุทธวิบูลย์, ยุพาวดี ชันทบัลลัง, ดวงสุดา ศิริปัญญุมิ, สุมามิตา สวัสดิ์สินธุนาท, และคณะ. แนวปฏิบัติการพยาบาลผู้ใช้บริการที่ใช้กัญชาทางแพทย์. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์* 2566;15(1):250–65.
4. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสธนะพันธ์, ประไพ วงศ์สินคงม่น. ทีแอลซี: วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. *นันทบุรี: สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*; 2551.
5. Lester GE, Lewers KS, Medinac MB, Saftner RA. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis* 2012;27(1):102–7.
6. พงศ์ปณต ร่วมแก้ว. การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและสมานแผลในพืชพื้นบ้านไทย [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2558. 84 หน้า.
7. ปฐมพงษ์ เผือกลี, ภาณุรัฐ เดชะยนต์, จิตพิสุทธิ จันทรทองอ่อน, อรุณพร อีสุรัตน์. ฤทธิ์ต้านการแพ้ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมอ่อน. *ธรรมชาติเวชสาร* 2561;18:349–57.

8. Piani B, Ferfua C, Bortolomeazzi R, Verardo G, Baldini M. Development and optimization of an HPLC-PDA method for the determination of major cannabinoids in hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil obtained by hydrodistillation. Food Analytical Methods 2022;15(6): 1-10.
9. เสาวนีย์ กระสานตีสขุ, หทัยชนก รุณรงค์. การพัฒนาตำรับโลชั่นบำรุงผิว. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549.
10. วันเฉลิม สีหบุตร, สุวิทย์ ดวงจิตต์, บัญชา ยิ่งงาม, ชลลิตดา พิษญาจิตติพงษ์. การพัฒนาไบเจลกักเก็บน้ำมันงาสำหรับภาวะผิวแห้ง. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2561; 14(4):122-31.
11. นริศา สาสิงาม, มนต์ทิพย์ ชำของ. นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร: ดอกกานพลู ที่เตรียมโดยวิธี aqueous titration. ใน: การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9; 6-7 ธ.ค. 2555; นครปฐม. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน; 2555. หน้า 515-58.
12. Shafiq-un-Nabi S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ali J, Baboota S, Ahuja A, et al. Formulation development and optimization using nano emulsion technique: a technical note. AAPS Pharm SciTech 2007;8(2):E12-7.
13. สุมิตา นิยมเดชา, มุอำหัต นิยมเดชา. การทดสอบสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของกัญชา. วารสารวิชาการและการจัดการภาครัฐและเอกชน 2565; 4(2):155-66.
14. คันฉัตร สังข์ชุม, กมลวรรณ แจ่มชัด, อนุวัตร แจ่มชัด. ผลของใบกัญชาต่อคุณภาพเอกซเรย์ทนต์ที่มีส่วนผสมหลักจากแป้งถั่วเหลืองสกัดไขมัน. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 62; 5-7 มี.ค. 2567; กรุงเทพมหานคร. กรุงเทพมหานคร: เครือข่ายวิจัยประชาชื่น; 2567. หน้า 581-90
15. สุวรรณิ์ แสนทวีสุข, ดวงใจ จงตามกลาง, ทศนัวรรณ สมจันทร์, ปิณฑิพัชร์ โตบัณฑิตภพ. ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด
ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรบางชนิด. วารสารแก่นเกษตร 2555;40(2):480-83.
16. อาวุธ หงส์ศิริ, อัจฉรา แก้วน้อย, อ้อมบุญ วลิสุต, อินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ. ฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำรับยาห้ารส มะขาม และข่า. วารสารสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 2566; 8(2):297-305.
17. Wanichpakorn S, Kedjarune-Laggat U. Primary cell culture from human oral tissue: gingival keratinocytes, gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. Songklanakarin Journal of Science and Technology 2010; 32(4):327-31.
18. ตรีเพชร กาญจนภูมิ. การหาโครงสร้างเคมีของสารแอมโรแมติกไกลโคไซด์ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2552.
19. ศิวกร ธีระวัชรชัย, คณิตกัญจน์ พักนุช, ภัทรศักดิ์ วัฒนธรรมนนท์. การพัฒนาตำรับยาแบบใหม่จากสารสกัดจากกัญชา [วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต]. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2564. 81 หน้า.
20. ผกาทิพย์ รื่นระเรงศักดิ์. กัญชากับการรักษาโรค [อินเทอร์เน็ต]. 2562. [สืบค้นเมื่อ 10 มิ.ย. 2567]. แหล่งข้อมูล: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/453/%EF%BF%BD%EF%BF%BD>
21. Rangsimawong W, Ngawhirunpat T. Nanoemulsions in transdermal drug delivery system. Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences 2014;9(2):46-61.
22. Verma D, Verma S, Blume G, Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. Int J Pharm 2003;4;258(1-2):141-51.
23. ธนวัฒน์ โปธา, ภาณุมาศ ภูมาศ, ดวงกมล ศักดิ์เลิศสกุล. การพัฒนานาโนอิมัลชันบรรจุน้ำมันยางนาสำหรับผิวแห้ง. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2565;18(2):63-75.

Phytochemical Screening and Anti-inflammatory Activity (Nitric Oxide) in Development of Knee Pain Relief Cream by Nanoemulsion from Cannabis sativa L. Extract

Sathaporn Satsue, M.Sc. (Pharmaceutical Chemistry and Natural Products)*; Wilailak Suksai, M.Sc. (Pharmaceutical Chemistry and Natural Products)*; Santi Phosri, Ph.D. (Biochemistry)**; Chatdanai Uparawanna, B.TM.*

* Kanchanabhishek Institute of Medical and Public Health, Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute; ** Office of Education, Faculty of Engineering, Burapha University, Thailand

Journal of Health Science of Thailand 2025;34(5):906–20.

Corresponding author: Sathaporn Satsue, Email: Satha.arm@gmail.com

Abstract: This study investigated the phytochemical components, anti-inflammatory activity, and development of a knee pain relief cream using nanoemulsion technology from cannabis leaf extract of the Charlotte's Angel strain, extracted with ethanol. The phytochemical analysis revealed that the cannabis leaf extract contains active ingredients such as alkaloids, saponins, tannins, terpenoids, and cardiac glycosides. The extract had a polyphenolic compound content of 72.70 ± 0.03 μg GAE/mg extract. The tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) analysis using high performance liquid chromatography (HPLC) presented that the CBD content was 208.2 ± 0.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and THC was 5.91 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The toxicity exploration of the cannabis leaf extract on human keratinocyte (HaCaT) and mouse macrophage (RAW 264.7) cells using the MTT assay showed that at concentrations of 1.56–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the percentage of cell viability was 106.17–13.12 for HaCaT and 96.15–10.58 for RAW 264.7. Extract concentrations above 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ exhibited cytotoxicity to the cells. For the anti-inflammatory activity, inhibition of nitric oxide release from LPS-stimulated RAW 264.7 cells at concentrations of 1.56 – 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ showed inhibition rates of 84.61 – 97.85%. The development of the knee pain relief cream using nanoemulsion technology from cannabis leaf extract resulted in a semi-solid cream product containing suspended small particles. Temperature changes under accelerated conditions (6 cycles) did not affect the emulsion's stability. Microbiological analysis displayed no growth of microorganisms and fungi. Size and zeta potential measurements using dynamic light scattering (DLS) indicated that the best formula had a hydrodynamic diameter of 234.52 ± 4.65 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.44 ± 0.02 , and a zeta potential of -29.60 ± 0.59 mV, representing good suspension stability. The results of this study provide a guideline for developing a knee pain relief cream using nanoemulsion technology from cannabis leaf extract. This product has the potential for further clinical development in the treatment of osteoarthritis in the elderly, which could significantly improve their physical quality of life in the future.

Keywords: cannabis sativa L. extract; knee pain relief cream; nanoemulsion